

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA



Facoltà di Medicina e Chirurgia
Dottorato in Scienze Endocrine e Metaboliche
Presidente: Chiar.mo Prof. Paolo Vitti

TESI DI DOTTORATO

*Livelli di Insulin Like Growth Factor-I e Insulin-Like Growth
Factor Binding Protein-3 nel liquido crevicolare durante
l'applicazione di una forza biomeccanica.*

Follow-up di dieci mesi.

Relatore:

Chiar.mo Prof. Claudio Giani

Candidata:

Dott.ssa Rinaldina Saggese

INDICE :

1- Riassunto

2- Introduzione

3- Scopo del lavoro

4- Materiali e metodi

5- Analisi statistica

6- Risultati

7- Discussione

8- Conclusioni

9- Bibliografia

RIASSUNTO

Il liquido crevicolare (CGF, Gingival Crevicular Fluid) è rappresentato da un complesso insieme di importanti fattori, quali citochine, enzimi e prodotti di degenerazione rilasciati, in parte, come risultato del rimodellamento osseo che avviene, a livello delle ossa mascellari superiore ed inferiore, durante il movimento fisiologico degli elementi dentari. È stato dimostrato (Saggese et al., 2005) che il CGF contiene sia IGF-I che IGFBP-3. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di descrivere il loro cambiamento durante un periodo di dieci mesi durante il quale sono state applicate delle forze biomeccaniche sugli elementi dentari dei pazienti presi in esame.

Sono stati reclutati per tale studio 89 pazienti, da cui successivamente ne sono stati selezionati 48 che soddisfacevano i criteri di inclusione necessari. Tali pazienti (21 maschi, 27 femmine di età compresa tra i 7 e i 16 anni) sono stati sottoposti a trattamento ortodontico tramite tecnica multibracket al fine di correggere una malocclusione, distalizzando i canini mediante l'applicazione una forza leggera e costante di circa 70 g.

I campioni di CGF sono stati prelevati prima dell'applicazione della forza (T0), dopo uno (T1), due (T2), tre (T3), sei (T4) e dieci mesi (T5) da entrambi i canini dell'arcata trattata e dal dente omologo non trattato, come controllo.

Per ogni campione di CGF sono state dosate le proteine totali presenti e i valori sia di IGF-I (tramite IRMA, Immunoradiometricassay) sia di IGFBP-3 (tramite IRMA e Western immunoblotting).

I livelli di IGF-I e di IGFBP-3 sono risultati maggiormente significativi ai tempi T1 e T2 rispetto al tempo T0, ma diminuivano gradualmente al tempo T3 e T4, per poi tornare a quelli basali al tempo T5.

Al contrario i livelli dei campioni ottenuti dagli elementi dentari utilizzati come controllo non sono mai cambiati ad ogni tempo preso in esame.

Come già osservato da un lavoro (Saggese et al., 2005), il presente studio conferma che il liquido crevicolare contiene IGF-I e IGFBP-3 e dimostra che il loro livello cresce durante il movimento ortodontico.

INTRODUZIONE

Il movimento dentario che si realizza durante il trattamento ortodontico è conseguenza dell'applicazione di forze d'intensità più o meno elevate attraverso l'utilizzo di sistemi biomeccanici mirati.

Lo spostamento deve avvenire nel modo meno traumatico possibile sia per l'elemento dentario che per i tessuti di sostegno al fine di evitare, o almeno minimizzare, eventuali danni radicolari e/o osteoparodontali.

Il dente non deve spostarsi attraverso l'osso ma deve trascinare con sé i tessuti di sostegno, rimodellando l'insieme del complesso dento-parodontale in quella che viene definita "traslocazione dento-alveolare" (Fontanelle, 1982). In questo modo, attraverso complessi fenomeni di riassorbimento e neoapposizione, il movimento dentale ortodontico realizza un rimodellamento paragonabile a quello che avviene nel corso dello spostamento fisiologico.

Le risposte istologiche che seguono l'applicazione di una forza ortodontica sono in relazione al tipo ed alla durata del movimento da realizzare, alle variabili biologiche soggettive (età, metabolismo, turnover tissutali, etc.), alle condizioni anatomiche (lunghezza radice, densità ossea, stato del parodonto, etc.) alle modalità biomeccaniche di applicazione della forza e, soprattutto, all'intensità della forza stessa.

La forza ideale dovrebbe essere in grado di fornire la miglior risposta biologica con la minima alterazione dei tessuti e permettere di ottenere uno spostamento rapido, confortevole e indolore per il paziente.

È possibile affermare che l'applicazione di forze leggere e costanti aumenti la probabilità di realizzare un rimaneggiamento osseo paragonabile a quello fisiologico.

Ad oggi, tuttavia, i dati disponibili in letteratura non permettono ancora di definire e standardizzare con esattezza le caratteristiche della forza ottimale (Ren et al., 2003).

Anche per ciò che riguarda i meccanismi che intervengono nel movimento dentale indotto ortodonticamente, i numerosi studi condotti in campo fisico, chimico e biochimico, non hanno fornito risultati che possano portare alla formulazione di una codifica precisa e consentono solo di avanzare delle ipotesi.

IL MOVIMENTO ORTODONTICO

EFFETTI DELLA TERAPIA ORTODONTICA SUL TESSUTO OSTEO-PARODONTALE

Il movimento ortodontico differisce da quello fisiologico per ampiezza, estensione e comparsa di reazioni specifiche.

L'elemento dentario interessato dallo spostamento è caratterizzato da una zona di pressione e da una di tensione, che subiscono meccanismi di rimodellamento diversi.

Dal lato in pressione, ossia il lato verso il quale si muove il dente, possiamo riconoscere essenzialmente tre fasi: la prima è caratterizzata da uno spostamento dentale rapido e si verifica dopo circa 90 secondi dall'applicazione della forza (Storey, 1973). Si tratta di un movimento reversibile dovuto sia alla deformazione elastica delle fibre collagene del legamento alveolo-dentale, la cui compressione è tanto più grande, quanto più elevata è l'intensità della forza applicata, sia ad una deflessione dell'osso alveolare non superiore a 0,1mm.

Le fibre collagene mantengono il loro orientamento in direzione dello spostamento e più intensa è la forza, più rapidamente si deformano.

L'autore ha valutato nei suoi studi le variazioni della permeabilità vasale a livello del legamento parodontale evidenziando, soprattutto nella zona sottoposta a pressione, la presenza di vasi lacerati circondati da eritrociti fuoriusciti nel tessuto extravascolare e di altri oblitterati.

Segue un periodo di stasi in cui il dente è immobile, che corrisponde al limite massimo della compressione delle fibre parodontali. Durante questa fase si verifica la ialinizzazione tissutale, reazione specifica del movimento ortodontico (Graber, 1974; Baron, 1974). A causa della compressione ed oblitterazione del circolo capillare, si verifica la scomparsa del nucleo di numerose cellule del legamento, come fibroblasti o cellule del Malassez, con il cambiamento della sostanza intercellulare. I fasci fibrosi tendono progressivamente a diminuire e a confondersi nella matrice

circostante, motivo per cui alcuni autori ritengono questa una fase di necrosi più che di ialinizzazione (Graziani, 1991).

Al contrario, è stato sottolineato (Reitan, 1961) che non tutte le cellule del legamento scompaiono e che non tutto il tessuto connettivo va distrutto: è infatti dalle cellule residue che si attiverebbe la ricostruzione.

Fattori meccanici, come direzione, tipo e intensità della forza e fattori anatomici, come il fatto che la parete alveolare possa essere liscia o irregolare, condizionano sede ed ampiezza della ialinizzazione. Questa perdura per circa 2-3 settimane durante le quali gli osteoclasti fisiologicamente presenti sulla superficie desmostale della parete alveolare scompaiono. La fase termina infatti nel momento in cui vengono attivati gli osteoclasti della parete endostale che riassorbono la sostanza ialina tramite un fenomeno detto “riassorbimento indiretto” (Reitan, 1961) o “riassorbimento sottominante” (Roberts et al., 1981). Nello spostamento fisiologico gli osteoclasti riassorbono il tessuto osseo disponendosi direttamente sulla superficie desmostale della compatta alveolare. Nello spostamento ortodontico, invece, si verifica un riassorbimento indiretto, con richiamo di osteoclasti sulla superficie endostale al fine di recuperare l'ampiezza fisiologica dello spazio parodontale attraverso la scomparsa della sostanza ialina.

A questo punto segue la terza fase, o spostamento secondario, durante il quale il movimento riprende in direzione della zona dove è avvenuto il riassorbimento. Gli osteoclasti si presentano nuovamente sulla superficie desmostale occupando però uno

spazio molto più ampio di parete alveolare. Il ciclo di eventi ricomincia con un nuovo riassorbimento osseo diretto.

Contemporaneamente, dalla parte opposta alla zona di compressione, ossia nella zona di tensione, si verifica una neoapposizione di tessuto osteoide, ma con fenomeni differenti a seconda della forza applicata: se vengono utilizzate forze leggere si verifica attivazione fibroblastica, mentre se vengono utilizzate forze pesanti, si instaura un vero e proprio processo infiammatorio, mitosi dei fibroblasti, stimolata dallo stiramento delle fibre legamentose (Reitan, 1961), fagocitosi dei detriti cellulari e deposizione di nuovo tessuto collagene.

Il tessuto osteoide neoformatosi va incontro rapidamente a mineralizzazione, formando osso con trabecole lunghe, sottili e immature nel caso che sia stata applicata una forza pesante, o viceversa osso con trabecole corte e spesse nel caso di una forza leggera (Storey, 1973).

Secondo altri autori (Mostafa et al., 1983), i meccanismi biologici alla base del movimento ortodontico sarebbero riconducibili a reazioni sia di tipo fisico che meccanico, interdipendenti tra loro. In base alla teoria fisica, lo spostamento dentario sarebbe provocato da un fenomeno piezoelettrico. In particolare, il flusso di ioni che attraversa la struttura durante l'applicazione di una forza genererebbe un potenziale di membrana. Questo potenziale incrementerebbe i livelli di AMPc intracellulare, con significato di secondo messaggero che a sua volta trasformerebbe lo stimolo extracellulare in una risposta precisa.

In modelli sperimentali *in vivo*, l'introduzione di microelettrodi nel solco gengivale ha permesso di osservare variazioni di potenziale sia a livello osseo, che nello spazio alveolare. La neoapposizione ossea è associata prevalentemente ad una concentrazione di cariche negative, mentre il riassorbimento ad una concentrazione di cariche positive.

Secondo la teoria biochimica, lo spostamento dentario sarebbe legato al fenomeno tensione-compressione e modificazione della permeabilità vasale, con conseguente rilascio di mastcellule e mediatori chimici come istamina e serotonina. Quindi, l'applicazione di una forza ortodontica causerebbe inizialmente alterazioni della circolazione sanguigna del legamento parodontale, con fuoriuscita di essudato dai vasi, seguita da un'invasione di cellule dell'infiammazione come linfociti, monociti e macrofagi. I linfociti agirebbero sui macrofagi inducendo la liberazione di alcuni mediatori del processo infiammatorio, quali, tra i più importanti, collagenasi, prostaglandine (PGs) e leucotrieni.

La collagenasi è un enzima che digerisce le fibre collagene; ciò è confermato dal fatto che, nel movimento indotto, si ritrova in concentrazione maggiore sia nel lato di pressione che di tensione.

Per azione della fosfolipasi A2 sui fosfolipidi di membrana si forma l'acido arachidonico, sul quale, successivamente, agisce una ciclossigenasi che determina la sintesi delle PGs.

Le PGs sono molto importanti perché determinano aumento dell'AMPc intracellulare e attivano gli osteoclasti responsabili del riassorbimento osseo.

Da alcuni studi (Nagai, 1989) è stato dimostrato che soprattutto le PGE2 fungono da inibitrici di alcune cellule osteoblastiche, mentre da altri è emerso che possono stimolare l'attivazione di osteoblasti e fibroblasti, determinando neoapposizione ossea.

Dalla stessa cascata enzimatica, ad opera di una lipossigenasi, si ha liberazione dei leucotrieni (LTH), mediatori fondamentali del processo flogistico che si instaura in seguito all'applicazione della forza ortodontica. Aumentando il rilascio di collagenasi e la permeabilità delle membrane agli ioni calcio viene modulata così la risposta cellulare.

È stato dimostrato (Mahammed et al., 1989) che le PGs ed i leucotrieni agiscono in concomitanza tra loro.

Altri importanti mediatori chimici che intervengono sul rimodellamento del tessuto connettivo sono rappresentati da citochine, interleuchine e fattori di crescita. Questi agiscono come primi messaggeri sui recettori delle cellule e causano variazione della permeabilità.

È stato anche confermato il rilievo di un'aumentata espressione dell'mRNA dell'interleuchina-1 β (IL-1 β) e dell'IL-6 (Alashimi et al., 2001) nelle cellule del legamento parodontale. Queste due interleuchine sono coinvolte nella regolazione del metabolismo osseo. L'IL-6 possiede una potente azione osteoriassorbente, agendo

positivamente sulla differenziazione e reclutamento degli osteoclasti, mentre l'IL-1 β è coinvolta nel processo di rimodellamento osseo (Kurihara et al., 1990). Il rilievo di una sintesi *de novo* di queste citochine in risposta all'applicazione di forze ortodontiche è in accordo con quello di aumentati livelli delle due stesse interleuchine nel liquido crevicolare durante trattamento ortodontico (Uematsu et al., 1996; Grieve et al., 1994). Quest'ultima osservazione ha sollevato molto interesse, potendo rappresentare una modalità poco invasiva da un lato per studiare i meccanismi fisiopatologici che stanno alla base delle alterazioni del turnover osseo, dall'altro per monitorare lo spostamento dentario in corso di trattamento ortodontico.

Quindi, attraverso fenomeni di rimodellamento continuo, sia dal lato di pressione che da quello di tensione, il dente si sposta, non attraverso l'osso ma con tutto il suo supporto osteo-parodontale.

MOVIMENTO ORTODONTICO E FATTORI DI RIMODELLAMENTO OSSEO NEL LIQUIDO CREVICOLARE

Il liquido crevicolare (Gingival Crevicular Fluid, CGF) può essere considerato, in condizioni fisiologiche, come un trasudato del fluido interstiziale gengivale che, in corso di gengivite o parodontite, diviene un vero essudato infiammatorio (Uitto, 2000). Di tale fluido fanno parte sostanze che derivano dal siero, tra cui anticorpi,

enzimi e prodotti di degradazione tissutale, leucociti, cellule strutturali del parodonto e batteri del cavo orale (Uitto, 2000).

Molti studi sono stati eseguiti con lo scopo di indagare il comportamento, nel liquido crevicolare, di fattori coinvolti nel rimodellamento osseo durante trattamento ortodontico. A tale proposito, come già osservato, è stata dimostrata la presenza di alcune citochine come l'IL-6 e l'IL-1 β . La prima ha una potente azione osteoriassorbente, mentre la seconda partecipa attivamente ai processi del metabolismo osseo (Kurihara et al., 1990). I livelli di entrambe le interleuchine aumentano durante la terapia (Uematsuet et al., 1996; Grieve et al., 1994; Tokimasa et al., 2003).

Alcuni autori hanno rilevato un aumento dei livelli di condroitin solfato (Last et al., 1988), mentre altri di glicosaminoglicani (Samuels et al., 1993), ritenendo che questi cambiamenti potessero riflettere le modificazioni che avvengono nei tessuti periodontali più profondi, indotte dall'applicazione di forze ortodontiche.

Uno studio ha riportato un aumento dei livelli di acido lattico e acido citrico nel liquido crevicolare, durante la terapia ortodontica, suggerendo una loro relazione con il riassorbimento dell'osso alveolare (Miyajima et al., 1991).

La valutazione dei livelli circolanti di fosfatasi acida e alcalina viene routinariamente eseguita per studiare il turnover osseo nell'uomo. Partendo da questo presupposto, alcuni autori hanno valutato il comportamento di questi due enzimi nel liquido crevicolare in pazienti in trattamento ortodontico, osservando che il cambiamento della loro attività può riflettere i processi biologici che avvengono localmente durante

il movimento dentario (Insoft et al., 1996). In particolare, l'attività della fosfatasi alcalina aumenta precocemente, durante una fase di scarso movimento dentario, in parte anche per l'infiammazione gengivale presente all'inizio del trattamento. A questo segue un innalzamento dell'attività della fosfatasi acida durante la fase di rapido movimento dentario. Queste oscillazioni suggeriscono che il comportamento nel tempo dell'attività dei due enzimi potrebbe riflettere il rimodellamento dell'osso alveolare (Insoft et al., 1996) che, come già osservato, è caratterizzato da periodi di attivazione, riassorbimento, quiescenza e formazione (King et al., 1991). Il trattamento ortodontico determinerebbe la sincronizzazione dei cicli di rimodellamento osseo (Insoft et al., 1996).

Più recentemente, due studi longitudinali, controllati, hanno valutato nel liquido crevicolare l'andamento dell'attività della fosfatasi alcalina (Perinetti et al., 2002) e dell'aspartato amino-trasferasi (AST) (Perinetti et al., 2003), durante il trattamento ortodontico. Il livello di attività di ciascun enzima è stato analizzato sia a livello dei siti di compressione che di trazione del periodonto. Gli autori hanno così osservato che la fosfatasi alcalina era significativamente più elevata nei siti di trazione che di compressione (Perinetti et al., 2002), mentre per quanto riguarda il comportamento dell'attività della AST, i livelli più elevati sono stati osservati nei siti sottoposti a compressione (Perinetti et al., 2003). Gli autori concludono che i livelli di attività dei due enzimi riflettono le modificazioni dell'attività biologica indotte nel periodonto in relazione al trauma occlusale controllato e che possono essere, quindi, utilizzati nella pratica clinica come indice per monitorare il corretto movimento dentario.

Altri autori hanno recentemente riportato la presenza di prodotti di degradazione della regione carbossi-terminale del collagene nel liquido sinoviale, suggerendo il loro ruolo come marker di riassorbimento di tessuto osseo (Schubert et al., 2001).

IL SISTEMA IGF-I (INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-I)-IGFBPs (INSULINLIKE GROWTH FACTOR BINDING PROTEINS): EFFETTI SUL METABOLISMO OSSEO

L'IGF-I è un polipeptide di 70 aminoacidi che fa parte della famiglia dei fattori di crescita delle IGF e molecole correlate. La famiglia delle IGF è costituita da ligandi (IGF-I, IGF-II e insulina), da sei ben caratterizzate proteine che legano le IGF con alta affinità (IGFBPs 1-6) e da recettori di membrana che mediano le azioni dei ligandi (Hwa et al., 1999).

IGF-I

L'IGF-I riveste un ruolo molto importante nella crescita, sviluppo e differenziazione di molti tessuti soprattutto nella vita postnatale. L'importanza degli effetti dell'IGF-I è stata dimostrata sia in modelli sperimentali di inattivazione genica, sia dall'osservazione che animali con delezione del gene dell'IGF-I hanno una riduzione

della crescita prenatale di circa il 30% e muoiono immediatamente dopo la nascita (Liu et al., 1998).

Il fegato è la sede di maggiore produzione di IGF-I circolante. Come già accennato questo fattore di crescita è prodotto localmente da molte specie cellulari sulle quali agisce con meccanismo paracrino/autocrino (Hwa et al., 1999).

Alcuni studi hanno dimostrato che l'IGF-I viene sintetizzata dagli osteoblasti e che esercita importanti azioni sul rimodellamento osseo. L'IGF-I induce la sintesi di DNA e la proliferazione degli osteoblasti, presumibilmente delle cellule preosteoblastiche, che si differenziano in osteoblasti. Un effetto importante di questo fattore di crescita è la stimolazione delle funzioni degli osteoblasti differenziati, come l'induzione della produzione di osteocalcina, la principale proteina ossea non collagene, e del collagene tipo I, determinando un aumento dell'apposizione di matrice ossea (Canalis et al., 1989).

Alcuni studi hanno dimostrato che l'IGF-I ha un'azione stimolatoria sul reclutamento degli osteoclasti, suggerendo quindi un suo ruolo anche nei processi di riassorbimento osseo (Mochizuki et al., 1992).

IGFBPs

Le IGFBPs sono codificate da una famiglia di sei geni che hanno una organizzazione strutturale molto simile. Tali proteine sono state originariamente descritte come semplici proteine di trasporto per le IGF; attualmente si ritiene che esse abbiano un

ruolo molto importante nel circolo, nell'ambiente extracellulare e in quello intracellulare (Firth et al., 2002).

L'IGFBP maggiormente rappresentata nel circolo è l'IGFBP-3. Essa lega il 75% dell'IGF-I circolante in eterotrimeri, formati da una molecola di IGF-I , una di IGFBP-3 e una disubunità acido-labile (ALS) (Firth et al., 2002).

Comunque, tutte le 6IGFBPs sono anche presenti nel circolo in forma libera o legate con l'IGF-I a formare un complesso binario, che si ritiene possa attraversare la parete vascolare e lasciare il circolo. Il complesso ternario resta invece confinato al compartimento vascolare (Firth et al., 2002).

Le cellule ossee sintetizzano le IGFBPs e la loro espressione e regolazione è specifica della linea cellulare. Osteoblasti non trasformati e coltivati *in vitro* esprimono l'RNAm per l'IGFBP-2, 3, 4, 5 e 6 (Hassager et al., 1992).

Alcuni studi hanno dimostrato che l'incubazione con elevati livelli di IGFBP-3 inibisce la formazione di osteoblasti in vitro. Tale effetto inibitorio potrebbe essere dovuto al fatto che l'IGFBP-3 lega l'IGF-I sequestrandola e sottraendola all'interazione con il suo recettore (Salahifar et al., 2000). E' stata inoltre ipotizzata un'interferenza dell'IGFBP-3 con il recettore dell'IGF-I (Devi et al., 2000).

Studi di altri autori hanno dimostrato, al contrario, che le IGFBP-3 adese alla parete cellulare hanno una ridotta affinità per l'IGF-I con un'aumentata capacità di presentare correttamente il peptide al proprio recettore, esercitando quindi un'azione complessivamente stimolatoria (Conover, 2000). Un aspetto che rende ancora più complicato il funzionamento del sistema IGF-I-IGFBPs è la dimostrazione che

l'attività biologica di queste ultime inclusa la BP-3 venga modificata da alterazioni post-traslazionali indotte da specifiche proteasi che le inattivano (Firth et al., 2002).

Ad oggi, l'analisi del CGF è considerato un valido metodo per misurare la risposta cellulare *in vivo* (Lee et al., 2004).

L'insulin-like growth factor-1 (IGF-I) è un lungo peptide di 70 aminoacidi che fa parte della superfamiglia dei fattori di crescita IGFs e relativi fattori.

Un precedente studio preliminare (Saggese et al., 2005) ha mostrato che il CGF contiene una quantità dosabile sia di IGF-I e IGFBP-3, osservazione confermata successivamente anche da altri autori (Toia et al., 2005). Nel presente studio lo scopo è stato quello di investigare i cambiamenti di IGF-I e IGFBP-3 nel liquido crevicolare durante l'applicazione di una forza biomeccanica continua in un arco temporale di dieci mesi.

SCOPO DEL LAVORO

Poiché l'IGF-I e le IGFBPs, di cui la BP-3 è la più rappresentata nel circolo generale, sono fattori di crescita espressi dalle cellule ossee, è verosimile prevedere che essi possano avere un ruolo importante nel rimodellamento osseo, anche per gli effetti che hanno sulle cellule ossee stesse. Quindi, è possibile che cambiamenti nella sintesi o nell'attività biologica dell'IGF-I o delle sue proteine leganti possano essere responsabili di alterazioni del rimodellamento osseo.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di evidenziare la presenza di alcuni componenti del sistema IGF-I - IGFBPs nel liquido crevicolare in un gruppo di pazienti sottoposti a trattamento ortodontico per la correzione di una malocclusione. Inoltre, per un periodo di dieci mesi, negli stessi soggetti è stata studiata l'eventuale presenza di modificazioni dei livelli di IGF-I e IGFBP-3 durante il movimento degli elementi dentari.

MATERIALI E METODI

Sono stati reclutati per tale studio 89 pazienti, da cui successivamente ne sono stati selezionati 48 che soddisfacevano i criteri di inclusione necessari. Tali pazienti (21 maschi, 27 femmine di età compresa tra i 7 e i 16 anni) sono stati sottoposti a trattamento ortodontico tramite tecnica multibracket al fine di correggere una malocclusione, distalizzando i canini mediante l'applicazione una forza leggera e costante di circa 70 g.

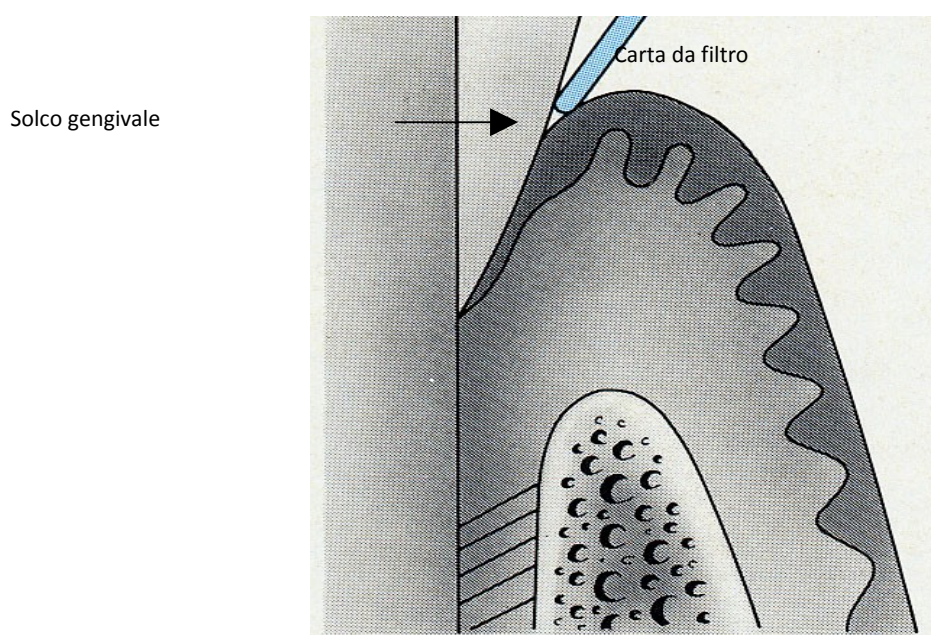
Tutti i soggetti reclutati per lo studio erano in buona salute e privi di malattie sistemiche. Dieci giorni prima dell'inizio del trattamento ortodontico e prima di ogni campionamento ogni paziente è stato sottoposto ad attenta seduta di igiene orale professionale. La scrupolosità e il risultato di tale procedura è stato verificato utilizzando l'Indice di Placca (Silness et al., 1964), ponendo particolare attenzione ai siti da analizzare.

In ogni caso, solo i soggetti con indice di placca < 1 , valutato tramite applicazione di reagenti rivelatori di placca, sono stati successivamente sottoposti a procedura di campionamento del liquido crevicolare. Nei casi in cui l'indice è risultato > 1 i soggetti stati rivalutati dopo cinque giorni, successivamente ad una nuova sessione di igiene professionale.

Il consenso informato è stato rilasciato ottenuto per iscritto.

I campioni di liquido crevicolare sono stati presi prima dall'applicazione della forza (T0), dopo 1 mese dall'applicazione della forza (T1), dopo due mesi (T2) dopo tre mesi (T3), dopo sei mesi (T4) e dopo 10 mesi (T5). I campioni sono stati prelevati da entrambi i canini da trattare e dal dente antagonista, come controllo.

Per ogni elemento dentario sono stati prelevati due campioni, uno dal lato sottoposto a compressione (lato distale) e uno dal lato sottoposto a tensione (lato mesiale), in accordo con il metodo proposto da Lamster et al. (1985). Il sito da sottoporre a campionamento è stato isolato tramite delicato getto d'aria e rulli di cotone per evitare la contaminazione con la saliva. Successivamente è stato delicatamente inserita una sottile striscia di carta sterile (Periopaper; Proflow Inc., Amitiville, USA) nel solco gengivale, facendola penetrare fino ad apprezzare una modica resistenza. Tale striscia è stata lasciata nel sito per la durata di 30 secondi, come mostra la figura di seguito, evitando di provocare il sanguinamento.



Una volta rimossa, è stata posta in una provetta da 500 μ l a 4°C, sul cui fondo era stato provocato un piccolo foro con ago da 21 G. Tale provetta è stata successivamente posta in una da 1,5 ml di maggiore dimensione. Altre tre nuove strisce sono state quindi inserite nel solco cervicale ad intervalli di 1 minuto e messe nella stessa provetta contenente la prima striscia. Le strisce sono state successivamente eluite con 50 μ l di 10mM di Tris Buffers, a pH 7,4, mediante centrifugazione a 4°C a 13,000 x g per cinque minuti. Al termine i campioni sono stati recuperati e le strisce nuovamente eluite con altri 100 μ l di tampone ottenendo un eluato finale non inferiore a 120 μ l.

Il campione è stato suddiviso in piccole aliquote, una delle quali è stata addizionata con una miscela di inibitori delle proteasi a una concentrazione di 10 μ l/ml (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA) ed utilizzata per dosare la quantità di IGFBP-3 tramite Western Immunoblotting. Tutti i campioni venivano refrigerati a -80°C prima di essere utilizzati per misurare i livelli di IGF-I e IGFBP-3, insieme con le proteine totali contenute (Sigma Chemical Company).

L'IGF-I e IGFBP-3 contenuti nel liquido crevicolare sono stati dosati tramite un sistema immunoradiometrico commerciale (IGF-I RIACT, Schering S.A., Paris, France e IGFBP-3 Bridge, BiochemImmunoSystems, Milan, Italy).

Per IGF-I la sensibilità del metodo era 1 ng/ml e il coefficiente di variazione intra ed interdosaggio erano rispettivamente 3.2% e 3.8%. Per quanto riguarda invece

l'IGFBP-3, la sensibilità era 0,5 ng/ml, mentre i coefficienti di variazione intra ed interdosaggio erano rispettivamente 1.8% e 0,5%. Il contenuto di IGF-I e IGFBP-3 presenti nei campioni di CGF sono stati espressi relativamente al contenuto di proteine totali.

IGFBP-3 è stato inoltre valutato tramite Western Immunoblotting. A tale proposito, il volume di ogni campione di CGF è stato analizzato in base ad una quantità di proteine totali di 30 µg ciascuno. Quindi, sono stati effettuati un' elettroforesi su un gel di poliacrilamide al 12,5 % (SDS-PAGE; 12% acrilamide e 0,5% bis-acrilamide) (Federico et al., 1999) ed un elettroblotting su membrane PVDF (polyvinilidene-difluoride). Le membrane sono state incubate per una notte a 4°C in buffer TBST (Tris-borato con 1% Triton X-100), con l'aggiunta di latte scremato al 5% per bloccare i siti aspecifici di legame sulla membrana. Successivamente le membrane sono state incubate a temperatura ambiente per circa 1 ora, sotto agitazione, con anticorpi policlonali di capra (Santa Cruz Biochem, USA), diluiti 1:1000 in buffer TBST. Le membrane venivano lavate in buffer TBST e incubate con un anticorpo anti - IgG di capra coniugato con perossidasi (Santa Cruz Biochem). Dopo 1 ora sono state nuovamente lavate e le bande specifiche per IGFBP-3 visualizzate con chemiluminescenza (Amersham, Milan, Italy). Le autoradiografie ottenute sono state successivamente analizzate con densitometria ottica (Pharmacia-LKB) e il confronto tra l'intensità delle bande è stato eseguito considerando le unità di assorbanza x mm.

Prima di procedere con lo studio avevamo eseguito un limitato numero di esami sul liquido crevicolare ottenuto da uno di noi (S.R.) al fine di convalidare il metodo di eluizione dei campioni di CGF dalle strisce. Il recupero di IGF-I e IGFBP-3 è stato misurato con metodo immunoradiometrico ed è risultato compreso tra il 95% -99% (Lamster et al., 1985).

ANALISI STATISTICA

I risultati sono espressi come significativi \pm SD. Poiché i dati erano normalmente distribuiti, un test one-way ANOVA è stato utilizzato per valutare se le differenze fossero significative. Il test Bonferroni è stato utilizzato per valutare quali parametri fossero differenti. Un $p < 0,05$ è stato considerato significativo.

RISULTATI

I dati hanno mostrato che CGF contiene una quantità dosabile di IGF-I. La figura 1 mostra i cambiamenti di IGF-I osservati negli elementi dentari sottoposti a trattamento ortodontico. Dopo uno (T1) e due mesi (T2) IGF-I è incrementato significativamente rispetto al livello basale (T0); dopo tre (T3) e sei mesi (T4), il contenuto di IGF-I invece è risultato significativamente più basso rispetto a quanto osservato dopo il primo e secondo mese, ma rimanendo comunque più elevato del livello iniziale (T0) e finale (T5).

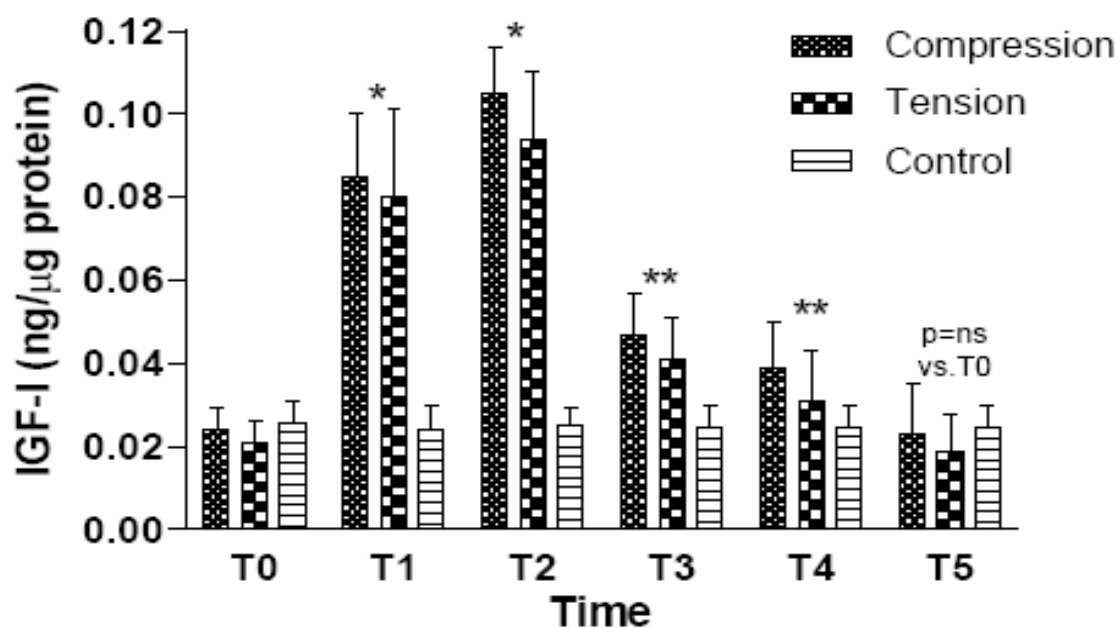


Fig. 1. Cambiamenti dei livelli di IGF-I nel CGF ai differenti tempi. I livelli di IGF-I non si sono mostrati significativamente diversi tra gli elementi dentari sottoposti a compressione e quelli sottoposti a tensione ad ogni tempo.

* $p < 0.001$ versus T0 e controlli e $p = ns$ tra lato sottoposto a compressione e quello sottoposto a tensione. ** $p < 0.01$ versus T1 e T2; $p < 0.05$ versus controlli e $p = ns$ tra compressione e tensione.

Il quantitativo di IGF-I osservato negli elementi dentari trattati non era significativamente differente da lato compressione e lato tensione ad ogni tempo preso in esame. Come atteso, il contenuto di IGF-I nel CGF ottenuto dai campioni dei denti controllo non era differente da quelli ottenuti dai denti trattati al tempo T0. Inoltre, tale valore non è mai cambiato ad ogni tempo preso in esame, come anche non si è trovata alcuna differenza tra lato mesiale e lato distale (che in questo caso non erano sottoposti a tensione e compressione).

IGFBP-3 ha mostrato un comportamento simile; il CGF contiene infatti una quantità dosabile di questa proteina legante al suo interno. La figura 2 riassume i cambiamenti osservati nei campioni ottenuti dagli elementi dentari trattati e quelli utilizzati come controllo. Come per IGF-I, l'ammontare di IGFBP-3 è risultato significativamente maggiore ai tempi T1 e T2 in confronto con gli stessi al tempo T0; tali valori decrescevano al tempo T3 e T4, rimanendo comunque significativamente più elevati rispetto al valore di base (T0) e finale (T5). Inoltre, i livelli ottenuti sia dal lato sottoposto a compressione che dal lato sottoposto a tensione si sono dimostrati comparabili. La quantità di IGFBP-3 ricavata dai campioni dei denti controllo era simile a quella ottenuta dai denti trattati al tempo T0, non cambiava significativamente ai vari tempi presi in esame e sia lato sottoposto a tensione che lato sottoposto a compressione potevano essere comparabili.

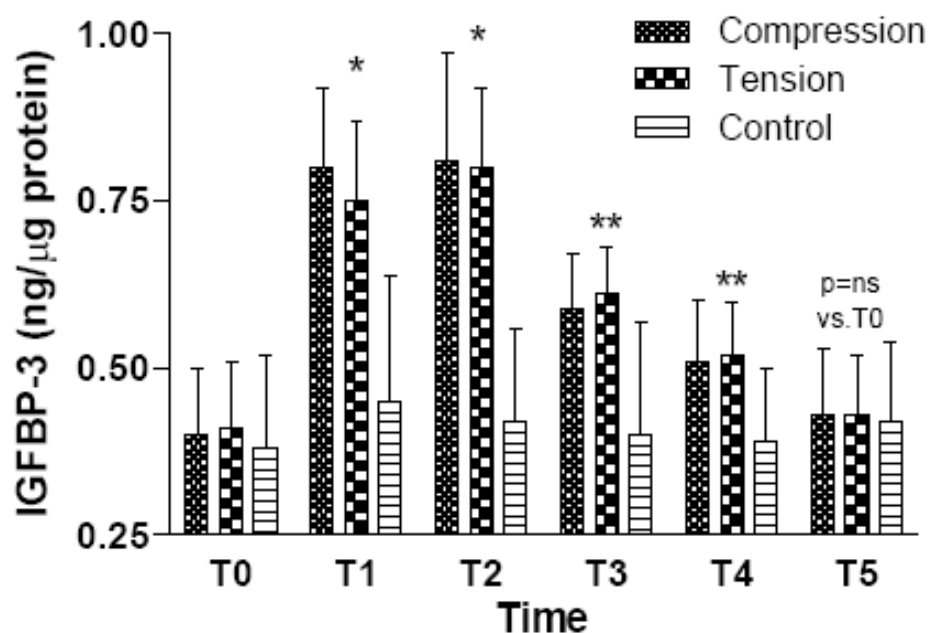


Fig. 2. Cambiamenti nel contenuto di IGFBP-3 nel CGF ai differenti tempi presi in esame negli elementi dentari sottoposti a compressione e tensione. I livelli di IGFBP-3 non si sono mostrati significativamente diversi tra gli elementi sottoposti a compressione e quelli sottoposti a tensione ad ogni tempo.

* $p < 0.001$ versus T0 e controlli e $p = ns$ tra lato sottoposto a compressione e quello sottoposto a tensione. ** $p < 0.01$ versus T1 e T2; $p < 0.05$ versus controlli e $p = ns$ tra compressione e tensione.

L'analisi eseguita con Western Immunoblotting ha mostrato che i campioni di CGF prelevati ai tempi T1, T2 e T3 dai denti trattati hanno dato origine a bande di maggiore intensità, indicando la presenza di un contenuto più elevato di IGFBP-3 in tali campioni rispetto a quelli ottenuti al tempo T0, T5 o a quelli controllo ad ogni tempo (figura 3).

Al tempo T4 le bande ottenute hanno dimostrato un'intensità inferiore rispetto ai tempi T1, T2 e T3, ma significativamente più elevata rispetto ai tempi T0, T5 e a quelli controllo ad ogni tempo.

Inoltre, le bande con la maggiore mobilità elettroforetica (con un MW di approssimativamente 29 e 21), che rappresentano frammenti proteolitici di IGFBP-3, sono risultate di intensità paragonabile tra i campioni di CGF ottenuti dai denti trattati e dai denti di controllo a tutti i tempi presi in esame.

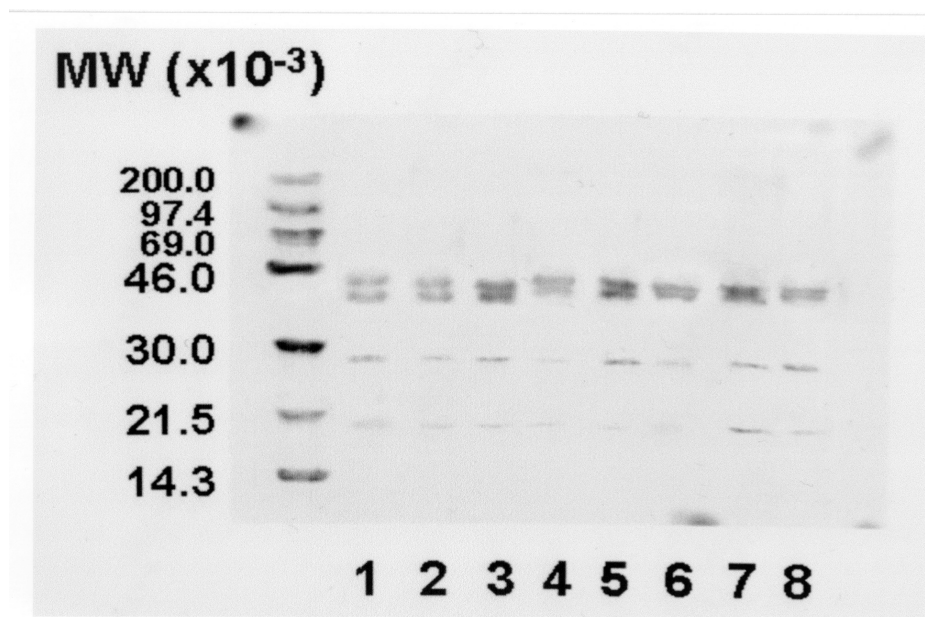


FIG 3. Autoradiogramma rappresentativo del WIB di IGFBP-3 contenuto nel CGF prelevato dagli elementi trattati e quelli utilizzati come controllo. La doppia banda con peso molecolare di 42-39 rappresenta la forma intatta di IGFBP-3, mentre le bande con peso molecolare di circa 29 e 21 rappresentano frammenti della proteina. Sulla parte sinistra: un marker del peso molecolare; linea 1: contenuto nel CGF denti trattati a T0; linea 2: denti di controllo a T0; linea 3: denti trattati a T1; linea 4: denti di controllo a T1; linea 5: denti trattati a T2; linea 6: denti controllo a T2; linea 7: denti trattati a T3; linea 8: denti trattati a T5.

La figura 4 riassume i risultati della valutazione densitometrica dei WIB. I dati sono stati espressi numericamente in rapporto alla densità ottica di appropriati controlli. Il contenuto di IGFBP-3 nel CGF è incrementato significativamente nei campioni ottenuti al tempo T1 e T2 a confronto con T0 ed è diminuito significativamente al tempo T3 e T4, seppur rimanendo più elevato rispetto al valore base (T0) e finale (T5).

La valutazione densitometrica ha confermato che i campioni di CGF ottenuti dai prelievi sui siti sottoposti a tensione e compressione avevano un contenuto di IGFBP-3 simile a tutti i tempi presi in esame.

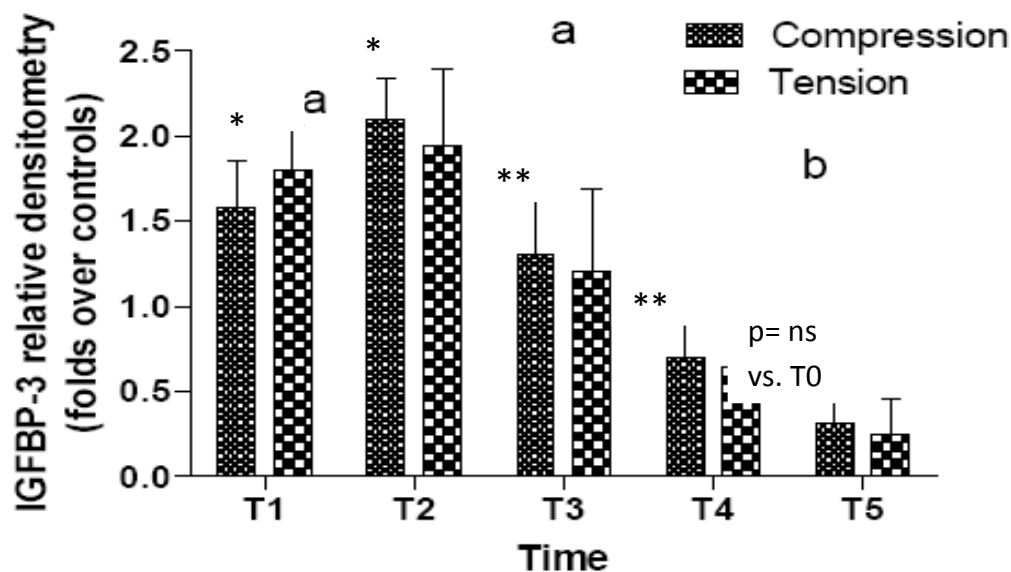


Fig 4 .Fotodensitometria di WIBs di CGF prelevato da elementi trattati e controllo. I dati sono espressi come numeri di volte di densità ottica confrontati con il livello al tempo T0.

* $p < 0.0001$ versus T0 e $p = ns$ tra lato sottoposto a compressione e quello sottoposto a tensione.

** $p < 0.01$ versus T1 e T2; $p < 0.05$ versus controlli e $p = ns$ tra lato compressione e lato tensione.

DISCUSSIONE

Questo studio è stato effettuato al fine di valutare se il liquido crevicolare contenesse o meno fattori di crescita, come IGF-I e la sua più importante proteina legante, IGFBP-3 e se il loro quantitativo variasse durante il movimento dentario indotto dall'applicazione di una forza biomeccanica. I risultati hanno confermato quanto già trovato da Saggese et al. (2005) e da Toia et al. (2005), ovvero che CGF contiene quantità misurabili di entrambi i fattori. Inoltre, è stato osservato che sia i valori di IGF-I che di IGFBP-3 sono significativamente aumentati in CGF a distanza di soli 30 giorni dall'inizio del trattamento ortodontico, rimanendo maggiormente elevati dopo due mesi e decrescendo significativamente dopo tre e sei mesi, pur rimanendo a livelli più elevati rispetto a quelli di partenza, per poi tornare ai livelli basali dopo dieci mesi (T5).

L'applicazione di una forza biomeccanica determina un movimento dentario che comporta la traslazione dell'intero PDL attraverso l'osso alveolare (Reitan 1960). L'irregolarità della radice e della superficie ossea alveolare può determinare ialinizzazione nell'area localmente interessata e soprattutto un rimodellamento osseo dal lato sottoposto a compressione. Quest'ultimo rappresenta un processo complesso in cui vi è un'interazione tra varie forze piezoelettriche e attività di mediatori intra ed extra-cellulari.

Precedenti studi sul contenuto di ALP in CGF ottenuto da prelievi effettuati sui primi premolari hanno mostrato una maggiore attività enzimatica nei campioni prelevati da elementi dentari sottoposti a forze ortodontiche (Insoft et al. 1996). Inoltre, i campioni ottenuti dai siti sottoposti a tensione hanno mostrato un'attività maggiore di ALP rispetto ai siti sottoposti a compressione (Perinetti et al., 2002). Poiché ALP rappresenta un marker di formazione ossea, è stato ipotizzato che tale differenza nell'attività enzimatica tra i due siti potesse riflettere il processo di rimodellamento osseo a livello parodontale con una neo-apposizione ossea dal lato sottoposto a tensione e un riassorbimento osseo dal lato sottoposto a compressione (Perinetti et al., 2002). Non sono state trovate differenze significative nella quantità di IGF-I e IGFBP-3 nei campioni di CGF ottenuti dal lato sottoposto a tensione e quello sottoposto a compressione, a nessun tempo preso in esame durante il nostro studio. Tale differenza tra ALP da una parte e IGF-I e IGFBP-3 dall'altra, potrebbe riflettere le loro diverse caratteristiche biologiche. Infatti come ricordato, mentre ALP è implicato principalmente nel processo di apposizione ossea (lato tensione), IGF-I e BP-3 sono prodotti dalle cellule ossee e sono presenti nel tessuto scheletrico (Bautista et al., 1990; Jones et al., 1995). Più specificatamente, è stato dimostrato che in vitro IGF-I può indurre sia la proliferazione di cellule osteoprogenitrici (Thomas et al., 1999) sia formazione e/o attivazione di osteoclasti (Mochizuki et al., 1992). IGFBP-3 si lega ai proteoglicani sequestrando IGF-I nella matrice extra-cellulare (Jones et al., 1995). Durante il processo di riassorbimento osseo, IGFBPs depositate nel tessuto scheletrico vengono rilasciate nella loro forma bioattiva (Mohan et al., 1995). Infine,

i livelli circolanti di IGF-I e IGFBP-3 aumentano durante la formazione osteogenica (Weiss et al., 2002). Messe insieme tali osservazioni suggeriscono che entrambi i fattori di crescita possano aumentare grazie ad una aumentata produzione durante la formazione ossea ed un rilascio aumentato durante il riassorbimento osseo.

Toia et al. (2005) hanno osservato una significativa riduzione della quantità intatta di IGFBP-3 con aumento di frammenti proteolitici in CGF dopo 10 giorni l'applicazione della forza ortodontica. Questi autori hanno concluso come tale riduzione potrebbe essere dovuta all'aumento dell'espressione delle metallo proteinasi della matrice ossea osservata proprio nel momento iniziale del movimento ortodontico dentale, ovvero entro le prime ore dall'applicazione della forza (Apajalahti et al., 2003). I presenti dati e quelli riportati da Toia et al. (2005), suggeriscono come la quantità di IGF-I e IGFBP-3 inCGF si comportino diversamente all'inizio e successivamente nella transazione del PDL. Alternativamente, le differenze tra i nostri risultati e quelli di Toia potrebbero dipendere dall'applicazione di una forza differente, non menzionata nel lavoro di quest'ultimi. Sicuramente forze diverse potrebbero produrre diversi gradi di stress meccanico e/o infiammazione portando a differenti espressioni di sostanze attive, quali citichine ed enzimi prodotte dalle cellule del periodonto.

Sebbene non sia stato osservato alcun sanguinamento durante i prelievi di CGF, la possibilità che i cambiamenti nei quantitativi di IGF-I e di IGFBP-3 possano riflettere una contaminazione da parte di sangue in circolo non si può escludere completamente. In ogni caso, è da sottolineare come il pattern di cambiamenti nei

livelli di IGF-I e IGFBP-3 sia risultato molto simile in entrambi i campioni di CGF, indicando che potrebbe siano cambiamenti non dovuti alla contaminazione con sangue. Inoltre, per motivi etici non è stato possibile raccogliere campioni di sangue per misurare i livelli circolanti di IGF-I e di IGFBP-3 per compararli con quelli trovati nel CGF, al fine di escludere la possibilità che i cambiamenti di CGF non fossero dovuti ad analoghi cambiamenti dei livelli circolanti dei due fattori. A tale proposito è da sottolineare che le modificazioni dei contenuti di IGF-I e IGFBP-3 nel CGF si sono verificate soltanto negli elementi dentari trattati, ma non in quelli controllo e che generalmente i livelli circolanti di IGF-I e IGFBP-3 sono invece molto stabili nei soggetti normali (Juul et al., 1997). Tutto ciò suggerisce che le modificazioni osservate nei campioni di CGF riflettano variazioni locali piuttosto che modificazioni endocrine dei livelli di IGF-I e IGFBP-3.

CONCLUSIONI

Il presente studio mostra che CGF contiene alcuni componenti del sistema IGF-I – IGFBPs e che i livelli di tali fattori di crescita si modificano durante l'applicazione di una forza biomeccanica agli elementi dentari. Tali cambiamenti potrebbero riflettere la risposta cellulare del legamento parodontale allo stress meccanico. In particolare, sembra che IGF-I e IGFBP-3, insieme ad altri fattori ben noti, quali alcune citochine pro infiammatorie, fosfatasi acida e alcalina, aspartatoaminotransferasi e PGE2, partecipino al rimodellamento dell'osso alveolare del mascellare superiore ed inferiore durante il movimento dentario meccanicamente indotto. Questa ipotesi è avvalorata da altri studi, che hanno dimostrato non solo come l'IGF-I rilasciato localmente migliori l'osteointegrazione nei casi di utilizzo di protesi implantari, riducendo la quantità di tessuto fibroso (Lamberg et al., 2006), ma anche come l'applicazione di una tensione biomeccanica continua possa regolare localmente il sistema IGF nel parodonto umano (Rath-Deschner et al., 2009), suggerendo ancora una volta il loro importante ruolo nel rimodellamento osseo.

I livelli più elevati di IGF-I e di IGFBP-3 rilasciati nel CGF potrebbero riflettere uno stress maggiore e/o un'attività di rimodellamento nel parodonto specialmente durante il periodo iniziale della transazione dentale (primo mese). Per tale motivo IGF-I e IGFBP-3 potrebbero risultare utili markers per studiare i movimenti dentari indotti dall'applicazione di una forza ortodontica. Inoltre, la presenza di modificazioni dei livelli di IGF-I e di IGFBP3 messa in relazione con le variazioni del rimodellamento

dell'osso alveolare sottoposto all'applicazione di forze biomeccaniche potrebbe rappresentare un indice valido e non invasivo per valutare l' interrelazione tra spostamento dentale e la produzione dei due fattori di crescita.

BIBLIOGRAFIA

Alashimi N, Frithof L, Brudvik P, Baklet M 2001. Orthodontic movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics 119: 307-312

Apajalahti S, Sorsa T, Railavo S, Ingman T 2003. The *in vivo* levels of matrix metalloproteinase-1 and -8 in gingival crevicular fluid during initial orthodontic tooth movement. Journal of Dent Research 82: 1018-1022

Baron R 1974. Le remaniement de l'os alvéolaire au cours du déplacement spontané et provoqué des dents. Revue d'Orthopédie Dento-Faciale 3:309-314

Bautista C M, Mohan S, Baylink D J 1990. Insulin-like growth factors I and II are present in the skeletal tissues of ten vertebrates. Metabolism 39: 96-100

Canalis E, Centrella M, Burch W 1989. Insulin-like growth factor-I mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone cultures. *The Journal of Clinical Investigation* 83:60-65

Conover C A 2000. In vitro studies of insulin-like growth factor-I and bone. *Growth Hormone & IGF Research. Supplement B: S107-S110*

Devi GR, Yang DH, Rosenfeld RG, Oh Y 2000. Differential effects of insulin-like growth factor binding protein-3 and its proteolytic fragments on ligand binding, cell surface association, and IGF-I receptor signaling. *Endocrinology* 141:4171-4179

Federico G, Maremmani C, Cinquanta L, Baroncelli GI, Fattori B, Saggese G 1999. Mucus of the human olfactory epithelium contains the insulin-like growth factor-I system which is altered in some neurodegenerative diseases. *Brain Research* 835: 306–314

Firth S, Baxter R 2002. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocrine Reviews* 23: 824-854

Fontanelle A. 1982. Une conception parodontale du mouvement dentaire provoqué: évidences cliniques. *Revue Orthopedic Dento Faciale* 16:37-53

Graber TM. 1974. Concetti e tecniche correnti di ortodonzia. Soc Ed Universo, vol. I, 60-89

Graziani E, Zelent ME, Pelliccioni GA. 1991. Aspetti biochimici del movimento ortodontico: recenti acquisizioni e prospettive future. *Mondo Ortodontico* Vol XVI.

Grieve W G III, Johanson J 1994. PGE and IL-1 β levels in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 105: 369-374

Hassager C, Fitzpatrick LA, Spencer EM, Riggs BL, Conover CA. 1992. Basal and regulated secretion of insulin-like growth factor binding proteins in osteoblast-like cells is cell line specific. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 75:228-233

Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG 1999. The insulin-like growth factor binding proteins superfamily. *Endocrine Reviews* 20:761-787

Insoft M, King G J, Keeling S D 1996. The measurement of acid and alkaline phosphatase in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 109: 287-296

Jones A R, Krall S, Lester G, D'Ercole A, Caterson B 1995. Interaction of proteoglycans with the insulin-like growth factors and their binding proteins. *Transplantation Orthopaedic Research Society* 18: 351-352

Jones J I, Clemmons D R 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine Reviews* 16: 3-34

Juul A, Skakkebaek N E 1997. Prediction of the outcome of growth hormone provocative testing in short children by measurement of serum levels of IGF-I and IGFBP-3. *Journal of Pediatrics* 130: 197-204

King GJ, Keeling SD 1991. Histomorphometric study of alveolar bone turnover in orthodontic tooth movement. *Bone* 12:401-409

Kurihara N, Bertolini D, Suda T 1990. Interleukin-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long-term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *The Journal of Immunology* 144:426-430

Lamberg A, Schmidmaier G, Søballe K, Elmengaard B 2006. Locally delivered TGF-1 and IGF-I enhance the fixation of titanium implants: A study in dogs. *Acta Orthopaedica* 77: 799 – 805

Lamster I B, Hartley L J, Vogel R I 1985. Development of a biochemical profile for gingival crevicular fluid. Methodological considerations and evaluation of collagen-degrading and ground substance-degrading enzyme activity during experimental gingivitis. *Journal of Periodontology* 56 (supplement):13-21

Last K S, Donkin C, Embery G 1988. Glycosaminoglycans in human gingival crevicular fluid during orthodontic movement. *Archives Oral Biology* 33: 907-912

Lee K J, Park Y, Yu H, Choi S, Yoo Y 2004. Effects of continuous and interrupted orthodontic force on interleukin-1 β and prostaglandin E2 production in gingival crevicular fluid. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics 125: 168-177

Liu JL, Grinberg A, Westphal H, Sauer B. 1998. Insulin-like growth factor-I affects perinatal lethality and postnatal development in a gene dosage-dependent manner: manipulation using the Cre/loxP system in transgenic mice. Molecular Endocrinology 12:1452-1462

Miyajima K, Ohno Y 1991. The lactic acid and citric acid content in the gingival fluid of orthodontic patients. Aichi Gakuin Dent Sci. 4:75-82

Mahammed AH, Tatakis DN, Dziak R 1989. Leukotrienes in orthodontic tooth movement. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics 95:231-237

Mochizuki H, Hakeda Y, Wakazuki N 1992. Insulin-like growth factor-I supports formation and activation of osteoclasts. Endocrinology 131: 1075-1080

Mohan S, Farley J R, Baylink D J 1995. Age-related changes in IGFBP-4 and IGFBP-5 levels in the human serum and bone: implications for bone loss with aging. *Progress Growth Factor Research* 6: 465-473

Mostafa YA, Dybvig MW, Osdoby P 1983. Orchestration of tooth movement. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 83: 3-14

Nagai M 1989. The effects of prostaglandin E2 on collagen synthesis in osteoblasts in vitro. *Calcified Tissue International* 44:411-420

Perinetti G, Paolantonio M, D'attilio M, Spoto G 2002. Alkaline phosphatase activity in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 122: 548-556

Perinetti G, Paolantonio M, D'attilio M 2003. Aspartate aminotransferase activity in gingival crevicular fluid during orthodontic treatment. A controlled short-term longitudinal study. *Journal of Periodontology* 74:145-152

Rath-Deschner B, Deschner J, Reimann S, Jager A, Gotz W 2009. Regulatory effects of biomechanical strain on the insulin-like growth factor system in human periodontal cells. *J Biomech.* 13;42(15):2584-9.

Reitan K 1960. Tissue behaviour during orthodontic tooth movement. *American Journal of Orthodontics* 46: 881-900

Reitan K. 1961. Behaviour of Malassez' epithelial rests during orthodontic tooth movement. *Acta Odontologica Scandinavica* 19:443

Ren Y, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman R 2003. Optimum force magnitude for orthodontic tooth movement: a sistematic literature review. *Angle Orthodontist* 73:86-92

Roberts WE, Goodwin WC, Heiner SR 1981. Cellular response to orthodontic force. *Dental Clinics of North America* 25:3-17

Saggese R, Federico G, Gandini P 2005. The IGF-I – IGFBPs system in the crevicular fluid. *Progress in Orthodontics* 6/I:114-117

Salahifar H, Firth SM, Baxter RC, Martin JL 2000. Characterization of an amino-terminal fragment of insulin-like growth factor binding protein-3 and its effect in MCF-7 breast cancer cells. *Growth Horm IGF Res* 10:367-377

Samuels R H, Pender N, Last K S 1993. The effect of orthodontic tooth movement on the glycosaminoglycan components of gingival crevicular fluid. *Journal of Clinical Periodontology* 20: 371-377

Schubert U, Kleber B M, Strietzel F P, Dorfling P 2001. Crosslaps and beta-glucuronidase in peri-implant and gingival crevicular fluid. *Internal Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 16: 252-258

Silness J, Loe H 1964. Periodontol disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontologica Scandinavica* 22: 121-128

Storey F 1973. Nature of tooth movement. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 63:3

Thomas T, Gorl F, Spelsberg T C, Khosla S, Riggs B L, Conover C A 1999. Response of bipotential human marrow stromal cells to insulin-like growth factors: effect on binding protein production, proliferation, and commitment to osteoblasts and adipocytes. *Endocrinology* 140: 5036-5044

Toia M, Galazzo R, Maioli C, Granata R, Scarlatti F 2005. The IGF-I/IGFBP-3 system in gingival crevicular fluid and dependance on application of fixed force. *Journal of Endocrinological Investigation* 28:1009-1014

Tokimasa C, Kawata T, Fujita T, Kaku M, Kohno S 2003. Effects of insulin-like growth facto-I on the expression of osteoclasts and osteoblasts in the nasopremaxillary suture under different masticatory loading conditions in growing mice. *Archives of Oral Biology* 48:31-38

Uematsu S, Mogi M, Deguchi T 1996. Interleukin $-\beta$, IL-6, TNF- β , epidermal growth factor, and β 2 microglobulin levels are elevated in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *Journal of Dental Research* 75: 562-567

Uitto V J 2000. Gingival crevice fluid – an introduction. *Periodontology* 31: 9-11

Weiss S, Baumgart R, Jochum M, Strasburger C J, Bidlingmaier M 2002.
Systemic regulation of distraction osteogenesis: a cascade of biochemical factors.
Journal of Bone & Mineral Research 17: 1280-1289